

野猪和几种家猪亲缘关系的 RAPD 分析*

常 青¹ 周开亚¹ 掌子凯² 曹 霄²

(¹ 南京师范大学生物多样性与分子进化研究室 南京 210097)

(² 江苏省农林厅畜牧局 南京 210024)

摘 要 对二花脸猪、红灯笼猪、姜曲海猪、香猪、约克夏猪及华东地区野猪共 24 个个体进行了随机扩增多态 DNA(RAPD)分析,以探讨家猪与野猪间的亲缘关系.实验从 40 个引物中选用重复性较好的 13 个引物对所有个体进行了随机扩增,共获得 192 个 RAPD 标记.RAPD 研究结果表明:(1)长江下游江苏地区家猪品种或类群内遗传变异相对较小,群体的遗传趋异程度处于较低水平;(2)二花脸猪、红灯笼猪及姜曲海猪与华东地区的野猪可能起源于一个共同的祖先;(3)中国家猪各地方品种可能由分布于各地区的亚洲野猪经人们长期的定向选育而形成.

关键词 野猪;家猪;系统演化;RAPD

中图法分类号 Q75 : Q959.842.03 + S828.2

STUDY ON PHYLOGENETIC RELATIONSHIP BETWEEN CHINESE WILD BOAR AND DOMESTIC PIGS USING RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)

CHANG Qing¹, ZHOU Kaiya¹, ZHANG Zikai² & CAO Xiao²

(¹ Biodiversity and Molecular Evolution Research Laboratory, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

(² Animal Husbandry Bureau, Jiangsu Agriculture and Forestry Department, Nanjing, China 210024)

Abstract RAPDs were used to study the genetic divergency and phylogenetic relationship of Chinese wild boar and 5 breeds or strains of domestic pigs, including Erhualian pig, Hongdenglong pig, Jiangquhai pig, Xiang pig and Yorkshire. 24 individuals were used in this study, and the phylogenetic tree was reconstructed using UPGMA method based on 192 RAPD makers which were amplified with 13 decamer primers. The results indicate that: (1) The domestic pigs exhibit relatively low level of genetic variation and poor genetic diversity in Jiangsu in the lower reaches of the Yangtze River; (2) Erhualian, Hongdenglong and Jiangquhai pigs have close phylogenetic relationship with the Chinese wild boar in eastern China, and they may have a common ancestor; (3) The domestic pigs in China are likely to have originated from wild boars distributing in different areas of China, and were impacted by the directive breeding of people.

Keywords Chinese wild boar; domestic pigs; RAPD; phylogenetic relationship

二花脸猪、红灯笼猪及姜曲海猪是华东地区繁殖率较高的几种优良地方猪种,近几年来在其种质特性、杂交利用及选育和保种研究上做了大量的工作^[1~3].在起源及彼此间亲缘关系研究上,形态学、考古、蛋白质多态分析及染色体等方面曾有报道^[2~6],分子水平亦有研究^[7~9].但以上研究所得结果有差异,在分子水平上未能与分布于华东地区的野猪进行系统比较.

本文旨在应用 RAPD 技术从基因组 DNA 遗传变异角度研究太湖猪中二花脸猪类群(简称 EHL)、山猪中的

红灯笼猪类群(HDL)及姜曲海猪(JQH)的遗传多样性,结合香猪(XZ)、约克夏猪(YKX)及华东地区野猪的北方亚种(*Sus scrofa monpinensis* YZ-1)和南方亚种(*S. S. chirodonta* YZ-2),分析彼此间的亲缘关系,以进一步探讨中国地方猪种的起源与演化.

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用血液、肝脏或肌肉组织取自 EHL、HDL、JQH、XZ、YKX、YZ-1 及 YZ-2 共 24 个个体.各类群动物的数量、组织类型及产地见表 1.除野猪外,每个个体都有完整的系谱记录.

表 1 实验用动物种类、组织类型及产地
Talbe 1 List of the samples used for RAPD analysis

品种或类群 Breeds or strains	数 量 N	组织类型 Tissue types	产 地 Localities
EHL(二花脸猪 <i>Sus scrofa domestica</i> , Erhualian pig)	6	血 Blood	锡山种猪场 Xishan Pig Breeding Farm, Jiangsu
HDL(红灯笼猪 <i>Sus scrofa domestica</i> , Hongdenglong pig)	6	血 Blood	溧阳种畜场 Liyang Pig Breeding Farm, Jiangsu
JQH(姜曲海猪 <i>Sus scrofa domestica</i> , Jiangquhai pig)	7	血 Blood	海安种畜场 Haian Pig Breeding Farm, Jiangsu
XZ(香 猪 <i>Sus scrofa domestica</i> , Xiang pig)	1	肝 Liver	南京中医药大学实验动物场 Experimental Animal Breeding Farm, Nanjing Traditional Chinese Medicine University
YKX(约克夏猪 <i>Sus scrofa domestica</i> , Yorkshire pig)	1	肝 Liver	常熟种猪场 Changsu Pig Breeding Farm, Jiangsu
YZ-1(野 猪-1 <i>Sus scrofa chirodonta</i>)	2	肌 Muscle	江苏宜兴 Yixing, Jiangsu
YZ-2(野 猪-2 <i>Sus scrofa moupinensis</i>)	1	肌 Muscle	安徽淮北 North of the Huai River, Anhui

1.2 基因组 DNA 提取

血液中基因组 DNA 提取参照 Sambrook 等的方法^[10],肝脏和肌肉中基因组 DNA 提取参照 Jackson 等的方法^[11].所得到的 DNA 加适量的 TE 溶解,用紫外分光光度计测定 260 nm 与 280 nm 吸收值,计算 DNA 浓度和两者吸收比值.对吸收比值小于 1.9 的 DNA 样,重新酚-氯仿(含 1/24 体积的异戊醇)抽提纯化.调整最终 DNA 浓度至 50 ng/ μ L,置 4℃保存.

1.3 随机引物

实验共使用 40 个 10 bp 随机引物(OPG₀₁₋₂₀及 OPH₀₁₋₂₀),并参照 Rieseberg 等的方法^[12],对所有引物的可重复性进行了筛选.

1.4 PCR 反应和电泳

PCR 反应体系总体积为 30 μ L,其中含有 Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8.3;KCl 50 mmol/L;MgCl₂ 1.5 mmol/L;明胶 0.001%;dNTPs 100 μ mol/L;随机引物 0.2 μ mol/L;基因组 DNA 约 50 ng; *Taq* DNA 多聚酶 1 单位.反应混合物加入 *Taq* DNA 多聚酶前 97℃预变性 8 min,冷却后加入 *Taq* DNA 多聚酶,用 20 μ L 石蜡油覆盖. DNA 扩增采用 NT1109 型扩增仪(北京新技术运用研究所),反应过程包括 40 个循环,每循环进行 94℃变性 1 min,36℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,最后一个循环后再延伸 8 min.每次反应均设不含模板 DNA 的空白对照.扩增产物经含有 0.5 μ g/mL 溴化乙锭的 1.4%琼脂糖凝胶电泳 3 h ($E=2.5$ V/cm)后,紫外透射仪上观察结果并拍照.底片直接用 GS-700 型光密度仪(Bio-Rad 公司)扫描,扫描得到的图像用 Molecular Analyst™/PC 分析软件进行 DNA 扩增产物的判读.

1.5 数据分析

对随机扩增多态 DNA 片段的有或无,分别用“1”和“0”记录.个体间的相似性指数利用公式:

$$S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

计算,式中 n_{xy} 是个体 x 和 y 共有片段数, n_x 和 n_y 是每个个体所记录到片段总数^[13].类群内相似性指数(S)取类群内所有可能个体间 S_{xy} 的平均数.类群间的相似性指数(S_{ij}),取 i 和 j 类群间所有随机组合个体间相似性指数 S_{xy} 的平均值.各类群间的遗传距离(D_{ij}),利用下式对 S_{ij} 进行转换:

$$D_{ij} = -\ln(S_{ij} / \sqrt{S_i S_j})^{[14]}$$

其中 S_i 和 S_j 分别为 i 和 j 类群内相似性指数.

分析中分别计算每个引物及所有引物情况下的 S_i 、 S_j 、 S_{ij} ，并基于遗传距离 (D_{ij})，利用 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件包^[15]，采用非加权组平均法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 重建太湖猪及其它类群猪的系统发生树。重建系统发生树时，选择外来猪种约克夏猪为外群。

2 结果

2.1 DNA 扩增结果

在同样的扩增反应条件下，当引物浓度和模板 DNA 浓度在最初反应浓度的 $\pm 25\%$ 的范围内变动时，40 个随机引物中有 13 个引物得到的扩增结果比较稳定，重复性较好，分别是：OPG₀₅，OPG₀₈，OPG₁₀₋₁₃，OPG₁₇₋₁₈，OPH₀₂，OPH₀₄，OPH₀₈₋₀₉ 及 OPH₁₇₋₁₈。13 个引物共扩增出 192 条带 (或称作 RAPD 标记)，单个引物获得的 RAPD 标记在 3~16 之间。在家猪和野猪间及部分家猪品种内的个体间可检测到不同扩增带型 (图 1)。

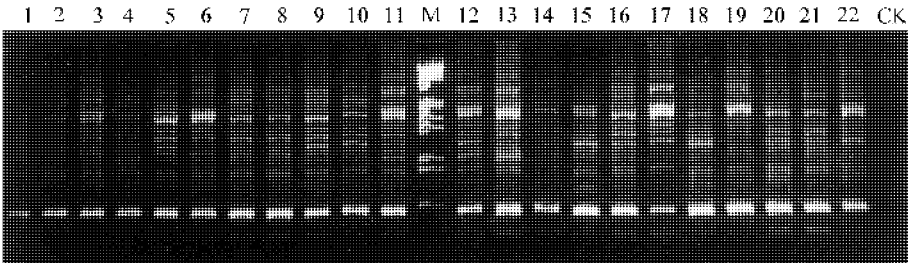


图 1 引物 OPH₁₈ 随机扩增 5 品种家猪和野猪猪基因组 DNA 产物的电泳图谱

Fig.1 Electrophoretic patterns of RAPD products form Chinese wild boars and the 5 breeds or strains of domestic pigs using primer OPH₁₈ 1~5:EHL; 6~11:HDL; 12~17:JQH; 18:YKX; 19:YZ-1; 20~21:YZ-2; M: λ EcoRI + Hind III (参见表 1 See Table 1)

2.2 品种间相似性指数及遗传距离

13 个引物的 RAPD 扩增结果分析表明，二花脸猪、红灯笼猪与姜曲海猪的品种内相似性指数分别为 0.9616、0.9473、0.8849。野猪及家猪 5 个品种间相似性指数数值位于 0.7749~0.9393 之间，平均值为 0.8584，其中野猪 I 与野猪 II 间相似性指数最大，其次是太湖猪中的二花脸与山猪中红灯笼猪类群间，相似性指数为 0.9241。姜曲海猪和约克夏猪间的相似性指数为最小。在 4 种中国地方猪种中，二花脸、红灯笼猪及姜曲海猪间相似性指数平均为 0.8918，大于香猪与它们间相似性指数的平均值 (0.8650)，二者在 $\alpha = 0.076$ 的水平上差异显著。约克夏猪与中国猪种间相似性指数平均为 0.7941，小于中国地方猪种间的平均相似性指数 (0.8816)，二者在 $\alpha = 0.001$ 的水平上差异显著。野猪和 5 个品种家猪 13 个引物扩增结果平均相似性指数及其 95% 的置信范围如图 2 所示。

根据野猪及 5 个品种家猪间相似性指数值，可得到彼此间的遗传距离 (表 2)。其中二花脸猪和红灯笼猪间的遗传距离最小，而约克夏猪与其它猪种间的距离均较大。

2.3 系统发生分析

根据遗传距离数据，采用 UPGMA 法重建了以上猪种的系统发生树 (图 3)。

3 讨论

3.1 遗传多样性

从 RAPD 研究结果来看，二花脸猪、红灯笼猪及姜曲海猪各品种或类群内相似性指数均较高，反映品种或类群内遗传变异性相对较小，多样性程度较低。在二花脸猪、红灯笼猪及姜曲海猪品种间，其相似性指数的平均值亦接近 0.9。这些反映在长江下游江苏地区家猪群体的遗传趋异程度处于较低的水平，这与中国地方猪种 mtDNA 的研究结果是一致的^[7, 16]。

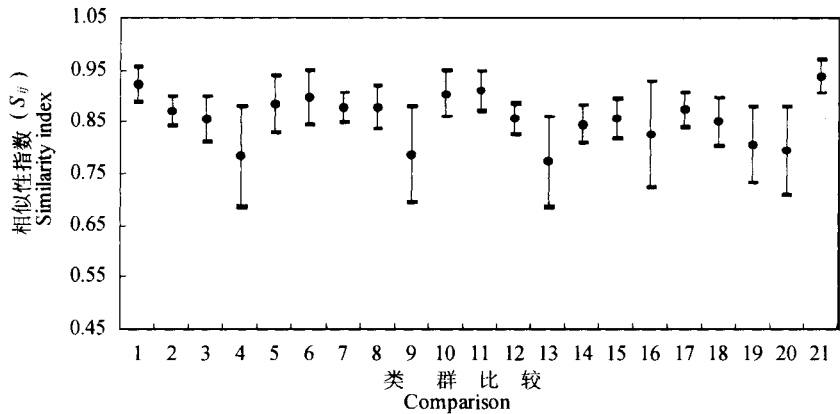


图 2 野猪和 5 个品种家猪间平均相似性指数(S_{ij})(示 95% 置信区间范围)

Fig.2 Average similarity (S_{ij}) across all primers between Chinese wild boar and the 5 breeds or strains of domestic pigs with 95% confidence intervals

1: EHL/HDL 2: EHL/JQH 3: EHL/XZ 4: EHL/YKX 5: EHL/YZ-1 6: EHL/YZ-2 7: HDL/JQH 8: HDL/XZ 9: HDL/YKX 10: HDL/YZ-1 11: HDL/YZ-2 12: JQH/XZ 13: JQH/YKX 14: JQH/YZ-1 15: JQH/YZ-2 16: XZ/YKX 17: XZ/YZ-1 18: XZ/YZ-2 19: YKX/YZ-1 20: YKX/YZ-2 21: YZ-1/YZ-2

表 2 野猪和 5 品种家猪间遗传距离 (D_{ij})

Table 2 The genetic distance (D_{ij}) between Chinese wild boars and the 5 breeds or strains of domestic pigs

	EHL	HDL	JQH	XZ	YKX	YZ-1
HDL	0.032					
JQH	0.056	0.041				
XZ	0.135	0.101	0.092			
YKX	0.222	0.211	0.194	0.189		
YZ-1	0.101	0.072	0.105	0.133	0.214	
YZ-2	0.075	0.052	0.079	0.147	0.216	0.050

见表 1 See Table 1

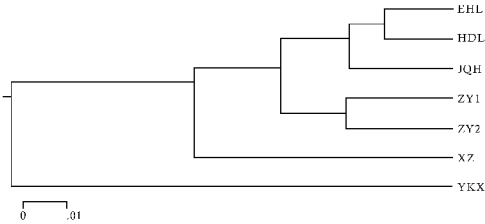


图 3 根据遗传距离用 UPGMA 法重建的野猪与 5 品种家猪的的系统发生关系(见表 1)

Fig.3 UPGMA dendrogram of Chinese wild boars and the 5 breeds or strains of domestic pigs based on the values of genetic distance (D_{ij}) calculated from the data for all primers (See Table 1)

3.2 二花脸猪、红灯笼猪及姜曲海猪间亲缘关系及其起源分析

在我国地方猪类型划分上,二花脸猪、红灯笼猪及姜曲海猪都为华北与华中的过渡猪种(即江海型).二花脸猪是太湖猪的一个类群,原产地主要在江苏省江阴市的申港、夏港、利港、西石桥、南闸等乡及武进的焦溪、郑陆、三河口等乡,是由太湖地区一个古老的属于华中型猪种的大花脸猪与属于华北型的小型淮猪杂交后,经长期选育而来.红灯笼猪目前划为淮猪中的山猪类群,主要分布于溧阳、溧水等地,普遍认为是淮北猪经过长期的人工和自然选择而成,在形成过程中已渗入了太湖猪中米猪的血缘.姜曲海猪原产于江苏省长江下游北岸高沙土地区的姜埭、海安一带,是通过华北型的“本种”和华中型的“沙种”长期轮回杂交而育成.因此,二花脸猪、红灯笼猪及姜曲海猪在形成历史上应有着较近的亲缘关系.

蛋白质多态分析及银染核仁组成区(Ag-NORs)的研究已表明,太湖猪和姜曲海猪间的遗传差异较小,亲缘关系较近,而与欧美猪种约克夏及长白猪间的遗传差异较大,亲缘关系较远^[4,6].mtDNA RFLP 分析发现,太湖猪中的二花脸猪与姜曲海猪具有相同的 mtDNA 限制类型,而与欧美猪种间则存在差异^[8].通过对 4 头二花脸猪及 1 头姜曲海猪的 RAPD 研究亦表明,二花脸猪与姜曲海猪间的亲缘关系较近,而与约克夏猪种间的关系较远(秦树臻,个人交流).本研究表明,二花脸猪、红灯笼猪及姜曲海猪三者间的亲缘关系较近,其中分布于太湖流域的二花脸猪及红灯笼猪间相似性指数较高,彼此间的遗传距离较小,亲缘关系最近,其次是红灯笼猪与姜曲海猪间,而它们与香猪及约克夏猪间的亲缘关系相对较远.此结果与前人的研究结果一致.

从图 2 来看,野猪-1 与野猪-2 间相似性指数数值最大,高于二花脸猪、红灯笼猪及姜曲海猪品种或类群

类,反映二者尽管在地理分布上不同,但遗传趋异程度仍然较低.从所构建的系统发生树来看(图3),红灯笼猪和二花脸猪属于同一支序,二者与姜曲海猪聚在一起后首先与野猪-1和野猪-2相聚,然后再与分布于西南地区贵州及广西一带的香猪聚在一起.因此,RAPD的分析表明,红灯笼猪、二花脸猪及姜曲海猪与生活在华东地区的野猪可能起源于一个共同的祖先.对红灯笼猪是否属于太湖猪中的一个类群,还有待与太湖猪各类群内及类群间的遗传多样性进行比较分析.

3.3 中国地方猪种的起源

对中国家猪的起源,考古学、形态学和细胞遗传学等方面已有报导,亦存在不少分歧^[1,5,6].在分子水平上,对几种野猪、中国大陆地方猪种及台湾本地猪的 mtDNA 的遗传变异研究表明,中国各地的家猪可能共同起源于一个较为晚近的亚洲野猪^[7,17,18].对西南地区的家猪和野猪 mtDNA 遗传多样性研究则揭示西南地区的家猪可能有一个共同的野生祖先,这一野生祖先与生活在中国西南及附近地区的野猪具有很近的亲缘关系^[16].本研究结果表明,红灯笼猪、二花脸猪及姜曲海猪与生活在华东地区的野猪间亲缘关系较近,它们可能有一个共同的祖先;香猪与分布于华东地区的家猪及野猪亲缘关系相对较远,它不可能源于华东地区家猪及野猪的共同祖先.在所构建的系统发生树中,香猪处于独立的位置上,红灯笼猪、二花脸、姜曲海猪猪及华东地区野猪先聚在一起后才与香猪相聚,约克夏猪为其外群(outgroup).因此,仅从分布于华东和西南地区的家猪与野猪间关系来看,中国家猪各地方品种可能由分布于各地区的亚洲野猪经人们长期的定向选育而形成的.若进一步探讨整个中国地方猪种的起源是单一的还是多元的,则需对中国各地理区域野猪种群的遗传变异进行深入研究.

参考文献

- 1 许振英.中国地方猪种种质特征.杭州:浙江科技出版社,1988
- 2 太湖猪育种委员会.中国太湖猪.上海:上海科技出版社,1991
- 3 姜曲海猪育种科研协作组.中国姜曲海猪.南京:江苏科技出版社,1995
- 4 孙有平,夏祖灼,甘杰.太湖猪银柴核仁组成区的研究.南京农业大学学报,1993, 16(1):72~77
- 5 詹铁生,袁志发,柳万生.银柴核仁组织区(Ag-NOR)与家猪品种的起源进化.畜牧兽医学报,1989, 20(1):1~6
- 6 Tang H, Lu X. Study on serum protein and enzyme polymorphisms in some Chinese local pig breeds. In: China Society of Animal Science and Veterinary Medicine, Northeast Agricultural College, Harbin, China. Proceedings of the international symposium on Chinese pig breeds. Harbin: Northeast Forestry University Press, 1992. 185~191
- 7 黄勇富,张亚平,兰宏,肖永祚,曾凡同,印祥聘.家猪的两大起源系统:来自线粒体 DNA 多态性的证据.见:中国畜牧兽医学学会第十届全国会员代表大会暨学术年会论文集.北京:中国农业出版社,1996.142~146
- 8 秦树臻,吴平,周开亚,王勇,陈鸿钊.太湖猪 mt DNA 限制性片段长度多态的研究.见:中国畜牧兽医学学会数量遗传研究会.第八次全国动物遗传育种学术讨论会论文集.北京:中国农业科技出版社,1995.100~106
- 9 吴平,周开亚,秦树臻.二花脸猪与华北野猪线粒体 DNA 限制性位点图的比较研究.见:中国畜牧兽医学学会数量遗传研究会.第八次全国动物遗传育种学术讨论会论文集.北京:中国农业科技出版社,1995.86~90
- 10 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatic T. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 464~467
- 11 Jackson DP, Hayden JD, Quirke P. Extraction of nucleic acid from fresh and archival material. In: McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR ed. PCR: A Practical approach. New York: Oxford University Press, 1991. 29~50
- 12 Rieseberg LH, Gerber D. Hybridization in the Catalina island mountain Mahogany (*Cercocarpus traskiae*): RAPD evidence. *Conservation Biol.* 1994, 9(1):199~203
- 13 Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting, *Mol Biol Evol*, 1990, 7:478~484
- 14 Lynch M. Analysis of population genetic structure by DNA fingerprinting. In: Burke T, Dolf G, Jeffreys AJ *et al.* ed. *DNA Fingerprinting approaches and Applications*. Basel: Basel University Press, 1991. 113~126
- 15 Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis, ver 1.01. University Park: The Pennsylvania State University, 1993
- 16 Lan H, Shi L. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in southwest China: An approach from mitochondrial DNA polymorphism, *Biochem Genet.* 1993, 31(112): 51~60
- 17 Watanabe T, Hayashi Y, Ogasawara N, Tomita T. Polymorphism of mitochondrial DNA in pigs based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochem Genet.* 1985, 23:105~113
- 18 Watanabe T, Hayashi Y, Kimura J, Yasuda Y, Saitou N, Tomita T, Ogasawara N. Pig mitochondrial DNA: Polymorphism, restriction map orientation, and sequence data. *Biochem Genet.* 1986, 24:385~396